

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Scheiffarth)

Die Differenzierung von B-Zellen und T-Zellen im Liquor und Blut

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Josef Teuber

aus Eger

1975 # 383

Aus dem Institut und Poliklinik für klinische Immunologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. F. Scheiffarth)

Die Differenzierung von B-Zellen und T-Zellen im Liquor und Blut

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Josef Teuber

aus Eger

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 03. November 1975

Herrn Professor Dr.F.Scheiffarth
fühle ich mich für die Überlas-
sung des Themas zu dieser Arbeit
zutiefst verpflichtet.

Ich möchte nicht versäumen, Herrn
Professor Dr.H.H.Wieck für die
Bereitstellung des Patienten-
gutes zu danken.

Verbindlichst danke ich auch
Herrn Priv.-Doz.Dr.H.W.Baenkler
für die vielfachen Anregungen
und wohlwollende Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
Problemstellung	5
I. ISOLIERUNG DER LYMPHOZYTEN AUS LIQUOR UND BLUT	7
1. Blut	7
2. Liquor	7
3. Modifikationen	8
II. CHARAKTERISIERUNG DER LYMPHOZYTEN	18
1. T-Zellen	8
2. B-Zellen	10
III. QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER IMMUN- GLOBULINE IGG, IGA, IGM	12
1. Serum	12
2. Liquor	12
3. Krankengut	13
4. Einzeluntersuchungen	14
IV. ERGEBNISSE	15
STATISTISCHE ANALYSE	22
DISKUSSION	23

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	27
LITERATURVERZEICHNIS	29
ABBILDUNGEN	

Einleitung

Experimentelle und klinische Forschungen haben der Immunologie Kenntnisse vermittelt, die bis in molekularbiologische und genetische Einzelheiten gehen. Die entsprechenden Gesetzmäßigkeiten sind auf Grund der hierbei angewandten Techniken allerdings am Verhalten isolierter Elemente oder speziell präparierter Organismen abgeleitet worden. Heute wendet sich die immunologische Forschung vor allem im Hinblick auf die Anwendung in der Klinik insbesondere funktionellen Problemen auf zellulärer Basis zu. Im Zusammenhang mit der Aufklärung der Organisation und der Struktur des Immunsystems ist die funktionelle Diagnostik auch im Rahmen der klinischen Forschung in den Mittelpunkt gerückt. Interesse wird hier der Differenzierung von Immunozyten geschenkt, da ihr Verhalten eher Rückschlüsse auf pathogenetische Zusammenhänge gestattet als die Beobachtung der durch sie bedingten Effekte. Während auf diesem Sektor mit Bezug das Verhalten des Immunsystems im zirkulierenden Blut und im lymphatischen Apparat sowie in einzelnen Organen zahlreiche Beobachtungen mitgeteilt worden sind, liegen über die Verteilung der verschiedenen Populationen von Immunzellen im Zentralnervensystem, hier insbesondere auch im Liquor, keine Untersuchungsergebnisse vor. Ziel der vorliegenden Studie ist es daher gewesen, diese Fragen zu beantworten.

Problemstellung

Die Aufgabe des Immunsystems ist die Aufrechterhaltung der Individualität des Organismus. Dies bedeutet, daß alle exogenen und endogenen antigenen Faktoren eliminiert werden, sofern sie erkannt werden. Diese Aufgabe kann nur erfüllt werden, wenn das Immunsystem in allen Organen, Geweben und Flüssigkeitssystemen vertreten ist.

Repräsentiert wird das Immunsystem durch zelluläre Elemente. Sie sind bei der sogenannten zellvermittelten Immunreaktion unmittelbar an der Elimination der Antigene beteiligt. Immunzellen können darüberhinaus auch durch Synthese und Sekretion von Immunglobulinen im Rahmen der sogenannten humoralen Immunreaktion, unmittelbar mit den Antigen in Kontakt treten. (9)

Auch das ZNS wird vom Immunsystem geschützt. Hier liegt jedoch zufolge der anatomischen Barriere eine besondere Situation vor, die ein eigenständiges System erforderlich macht. Die Trennung vom übrigen Organismus bewirkt bis zu einem gewissen Grade eine Autonomie des Immunsystems im ZNS, was sich beispielsweise darin ausdrückt, daß die hier gefundenen Immunglobulin-Spiegel, auch im Liquor, erheblich von denjenigen des übrigen Organismus abweichen. Einzelne Immunglobulinklassen, nämlich IgD und IgE, sind offenbar normalerweise gar nicht vertreten. Darüberhinaus scheint eine Immunreaktion, die im ZNS abläuft, aufgrund der Barrieren gewissermaßen isoliert zu bleiben, wodurch Rückwirkungen auf den übrigen Organismus für gewöhnlich nicht bemerkbar sind.

(6, 7, 14, 3)

Ausgangspunkt jeder Immunreaktion ist die antigenreaktive Zelle,

die sich, unabhängig von den späteren Differenzierungsschritten, morphologisch als Lymphozyt darstellt. Die humorale Immunreaktion geht dabei auf die sogenannten B-Lymphozyten zurück. Diese werden unter dem Reiz des Antigen zu Plasmazellen transformiert, welche die Produktionsstätten der Immunglobuline darstellen (9). Diese Zellen haben die Eigenart der Ortsungebundenheit verloren und sind daher in größeren Mengen, außer im Knochenmark, nur in organisierten lymphatischen Gebilden zu finden (5). Isoliert finden sie sich also im intakten Organismus, im Liquor und Blut nur vereinzelt. Die seßhaften Plasmazellen des ZNS sind vorwiegend in der Hirnsubstanz, im Rückenmark, in den Hirnhäuten und im Plexus chorioideus gelegen (2, 6). Sie bewirken durch die Sekretion der diffusablen Immunglobuline eine gleichmäßige Verteilung dieser Antikörpermoleküle im gesamten Liquor. Normalerweise ist der Gehalt an Immunglobulinen im Liquor im Vergleich zum Serum außerordentlich gering. Die Normalwerte betragen für IgG im Liquor $1,76 \pm 0,41$ mg/100 ml gegenüber 800 - 1500 mg/100 ml im Serum, für IgA im Liquor $0,23 \pm 0,19$ mg/100 ml gegenüber 100 - 400 mg/100 ml im Serum (8,9,10). IgM und IgD kommen unter normalen Verhältnissen im Liquor nicht vor. IgE wurde bislang im Liquor noch nicht gefunden (6, 7).

Bezogen auf die Mengenverhältnisse des übrigen Organismus könnte somit von einem relativen Antikörpermangel im Liquor gesprochen werden. Dies macht sich allerdings klinisch nicht bemerkbar, da ein höherer Immunglobulinspiegel im Liquor infolge der außerordentlich geringen Gefahr einer Antigeneinschwemmung nicht erforderlich ist.

Für eine Vermehrung der Immunglobuline im Liquor lassen sich

unterschiedliche Ursachen anführen. Die wichtigsten sind Permeabilitätssteigerungen der Hirnschrankenfunktion und eine erhöhte lokale Immunglobulin-Produktion. Im initialen transsudativen Stadium lassen sich "liquorfremde" IgM-Globuline nachweisen. Zugleich steigen der Totalproteingehalt und die Albumine an. Danach erfolgt ein deutlicher Anstieg des IgA-Spiegels, meist begleitet von einer Vermehrung des als "akute Phase protein" geltenden α_2 - Glycoproteins sowie der Haptoglobine. Im weiteren Verlauf kommt es schließlich zu einem kontinuierlichen Anstieg des IgG-Gehaltes. In fortgeschrittenen Stadien sinkt die IgA- und IgM-Konzentration bei weiterem Anstieg des IgG-Spiegels. Mitunter wird ein Persistieren von IgM und IgG ohne die erwähnte Erhöhung anderer grobmolekularer Globuline beobachtet. In diesen Fällen ist für die Erhöhung der Liquorimmunglobuline ausschließlich die lokale Produktion verantwortlich (7,8,11,14).

Über den Katabolismus der Immunglobuline im Liquor ist nichts bekannt. Es ist anzunehmen, daß der Abbau nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten erfolgt wie im Serum, wobei der Katabolismus im Liquor und im übrigen Organismus unabhängig voneinander ablaufen dürfte.

Das normale Liquorzellbild weist vorwiegend lympho- und monozytäre Zellformen auf. Die absolute Zellzahl beträgt unter physiologischen Bedingungen im Durchschnitt 0,3 - 6,2 pro cmm. Davon sind 63-99 % lymphozytäre und bis zu 28 % monozytäre Zellformen (7,17). Bis zu 3 % des normalen Liquorzellbildes bestehen aus Ependym- und Epithelzellen des Plexus chorioideus. Granulozyten, große Retikulumzellen und Makrophagen werden nur bei gesteigerter Transsudation bzw. bei Blutungen in den Liquorraum angetroffen.

Während auf die Menge der B-Zellen aus dem Gehalt an den verschiedenen Immunglobulinen geschlossen werden kann, sind die T-Zellen schwer erfaßbar, weil sie keine der Immunglobulinproduktion entsprechende Funktion aufweisen und somit mit den üblichen Methoden nicht differenziert werden können. (16)

Das Verhalten von B- und T-Zellen ist tierexperimentell und beim Menschen insbesondere an Untersuchungen nach gezielter Antigenstimulation oder im Rahmen verschiedener Krankheitsprozesse verfolgt worden (4,12,16,21). Die wichtigsten Gesetzmäßigkeiten im intakten Organismus sind bereits geschildert. Ergänzend ist noch zu erwähnen, daß in der Zirkulation etwa 25-30 % der Lymphozyten der B-Zellreihe angehören und 60-70 % der Lymphozyten als T-Zellen zu charakterisieren sind (18). Über entsprechende Vergleichsuntersuchungen am Liquor ist bislang nichts bekannt.

Die skizzierte Situation ändert sich jedoch unter dem Einfluß antigener Faktoren. Diese können unterschiedlicher Natur, d.h. belebt oder unbelebt sein. Sie führen zu beträchtlichen Verschiebungen oder Zellpopulation. In diesem Zusammenhang muß auf das Ansteigen des Gehaltes an Immunglobulinen im Blut im Rahmen entzündlicher infektiöser Prozesse hingewiesen werden, wobei sich zugleich auch die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten erhöht. Dies beruht auf der Dynamik der Immunreaktion, die eine rasche und ergiebige Bereitstellung immunkompetenter Zellen zum Ziel hat. Ähnliche Verhältnisse liegen auch im Liquor vor. Während jedoch die Rekrutierung der einzelnen Populationen aus Lymphozyten der Peripherie ausgiebig untersucht ist. (5), liegen über entsprechende Studien an Liquorzellen keine Mitteilungen vor. Die Tatsache der Immunglobulinvermehrung im Liquor bei

verschiedenen Krankheitsprozessen ist an die vermehrte Aktivität der B-Zellreihe gebunden. Hier ist zufolge der noch erforderlichen Differenzierungsschritte eine zeitlich vorverlegte Vermehrung der B-Zellen zu erwarten. Bei einer Identifizierung dieser Zellen im Liquor muß daher eine vorzeitige Erhöhung des relativen Anteils von B-Zellen nachweisbar werden, die gegebenenfalls auch prognostisch verwertbar ist. Untersuchungen auf dieser Ebene lassen darüberhinaus erwarten, daß der B-Zellgehalt auch dann von der Norm abweichen kann, wenn die Immunglobulinspiegel unauffällig sind. Schließlich ist eine Mitreaktion des T-Zellsystems naheliegend.

Diese Fragen sollten in den vorliegenden Untersuchungen geklärt werden, wobei im Liquor und im Blut von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsprozessen B- und T-Zelldifferenzierungen vorgenommen und die Immunglobuline quantitativ erfaßt wurden. Die Aussagekraft sollte zugleich durch Längsschnittuntersuchungen an einzelnen Patienten erhöht werden. Hierzu wurden die üblichen Methoden der klinischen und experimentellen Immunologie angewandt.

Material und Methodik

I. Isolierung der Lymphozyten aus Liquor und Blut

1. Blut

Reagenzien:

Ficoll^R-Hypaque^R-Gradient (24 Teile 9 % V/W Ficoll^R Pharmazia und 10 Teile 33,9 % V/W Winthrop Hypaque^R), Hanks Lösung, Heparin (Vetren^R).

Die Trennung der Lymphozyten von den übrigen zellulären Bestandteilen erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Dichte durch Zentrifugieren auf dem Dichte-Gradienten (spez. Gew. 1,078), der eine Anreicherung der Lymphozytenpopulation (19, 22 %) auf 96 % ermöglicht. Hierzu wurden 20 ml Vollblut nach Entnahme in einer mit Heparin benetzten Plastikspritze mit 15 ml Hanks Lösung vermischt und mit 10 ml Ficoll-Hypaque unterschichtet. Anschließend wurde 50 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert. Die lymphozytenreiche, an der braunen Farbe erkennbare Phase über der farblosen Ficollschicht wurde vorsichtig abgezogen und 3 mal mit Hanks Lösung jeweils 10 Min. bei 1000 U/Min. gewaschen. Die nunmehr isolierten Lymphozyten wurden in 2 gleiche Portionen aufgeteilt.

2. Liquor

Die Isolierung der Zellbestandteile des Liquors erfolgte durch 20 minütiges Zentrifugieren bei 1000 U/Min. bei Zimmertemperatur in Plastikröhrchen. Danach wurde der Überstand vorsichtig bis auf einen Rest von 0,5 ml abpipettiert, das Sediment aufge-

schüttelt und 3 mal mit Hanks Lösung jeweils 10 Min. bei 1000 U/Min. gewaschen.

3. Modifikationen

Da die Isolierung der Lymphozyten über den Ficoll-Gradienten mit einem Verlust von mehr als 50 % verbunden war, konnte dieser Schritt nur bei einem vergleichsweise großem Angebot an Zellen vorgenommen werden. Liquorproben mit nur geringer Zellzahl wurden daher in der erwähnten Weise verarbeitet; der Ficoll-Gradient zur Selektierung der Lymphozyten wurde nur bei erhöhter Liquorzellzahl oder bei blutigem Liquor zur Entfernung der Erythrozyten herangezogen. Die Prüfung der so isolierten Zellen auf phagozytierende Elemente durch Zusatz von Polystyrol-Partikeln mit einem Durchmesser von 2μ (Latex-Difco) ergab, daß weniger als 10 % der zur weiteren Untersuchung verwendeten Zellen zur Phagozytose befähigt waren. Diese Befunde korrelieren mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren, die im nicht entzündlich veränderten Liquor im Durchschnitt 8 % Monozyten gefunden haben (19).

II. Charakterisierung der Lymphozyten

1. T-Zellen

Die Charakterisierung der T-Zellen basierte auf der Anwesenheit von Rezeptoren für Hammelerythrozyten an der Zellmembran (5). Der Nachweis erfolgte mit der Rosetten-Technik.

Reagenzien:

Gewaschene Hammelerythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung.

Nach Zählung der gewonnenen Zellen werden 0,5 ml einer 0,5 % Hammelerythrozyten-Konzentration mit 1×10^6 Lymphozyten pro ml bei 1000 U/Min. 5 Min. zentrifugiert und bei 1°C 4-8 Stunden inkubiert. Nach vorsichtigem Aufschütteln wurden einige Tropfen der Suspension auf einem Objektträger gebracht und unter einem Deckgläschen mikroskopisch ausgewertet (18).

Bei steigender HE-Konzentration bis 1 % bzw. bei Reduktion der Lymphozyten auf 1×10^5 Zellen/ml wurden entsprechend der Erfahrung anderer Autoren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl rosettenbildender Zellen beobachtet (18).

Mikroskopische Auswertung

Die Auszählung der rosettenbildenden Zellen erfolgte im Lichtmikroskop. Die Anzahl der gefundenen Rosetten wurde in Relativprozent zu den übrigen ausgezählten Zellen angegeben.

Als T-Zelle wurde ein Lymphozyt bewertet, der mehr als zwei Hammelerythrozyten an seine Membran angelagert hatte.

2. B-Zellen

Die Charakterisierung der B-Zellen erfolgte durch den Nachweis von membrangebundenen Immunglobulinen (5).

Reagenzien:

FITC-markiertes Antihumanglobulin (Hyland)

NaN_3 0,01 mol p.a. (Fa. Merck)

PBS (gepufferte Phosphatlösung ph 7,2)

Glycerin 96 %

50 μl des in der Originalpackung lyophilisierten und mit 1 ml Aqua dest rekonstituierten fluorescein-markierten Antihumanimmunglobulinserums wurde mit 10 ml PBS unter Zusatz von 0,1 ml NaN_3 - 0,01 mol - verdünnt. Von diesem Ansatz wurden 50 μl mit der gleichen Menge der vorher gewaschenen und auf eine Zellzahl von 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro cmm eingestellten Lymphozytensuspension in kleine Plastikröhrchen (40x2 mm) abgefüllt und vermischt. Nach 30 Min. Inkubation bei 4 °C wurde das Präparat 5 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand bis auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens verworfen und die Suspension 3 mal mit 100 μl PBS-Lösung gewaschen. Das Sediment wurde mit einem Tropfen Glycerin vermischt und ein Ausstrichpräparat angefertigt.

Mikroskopische Auswertung

Die Identifizierung der B-Zellen erfolgte auf dem Boden der durch UV-Licht angeregten Emission im sichtbaren Wellenbereich, wobei zur Sichtbarmachung der übrigen Zellstrukturen mittels eines Sperrfiltersystems wahlweise auch sichtbares Licht zugeschaltet werden konnte. Dadurch war es möglich,

einerseits die unter UV-Anregung erkennbare Fluoreszenz den einzelnen Zellen zuzuordnen, andererseits auch Zellen ohne Fluoreszenz zu erfassen.

Die Anzahl der fluoreszierenden B-Zellen wurde auf 100 der Gesamtzellen umgerechnet.

Modifikation

Zum Ausschluß einer Verfälschung der Ergebnisse durch falsche Rosetten, die auf der Anlagerung von Hammelerythrozyten an phagozytierenden Elementen bedingt sein könnte, wurde die Rosetten-Technik mit denselben Proben ein weiteres Mal unter Zusatz von Polystyrolpartikeln vorgenommen. Hierbei ließen sich Phagozyten durch die Aufnahme der Kunststoffpartikel identifizieren. Es konnte gezeigt werden, daß Zellen mit phagozytierenden Eigenschaften nur vereinzelt vorhanden waren und daß diese Zellen darüberhinaus keine Rosetten bildeten.

III. Quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgG, IgA, IgM

1. Serum

Die quantitative Erfassung der Immunglobuline wurde nach der von Mancini angegebenen Technik der radialen Immundiffusion, bei der die vom Präzipitatring eingeschlossene Fläche proportional zum Gehalt wächst, (15) mit vorgefertigten Immundiffusionsplatten (Behringwerke AG Marburg/Lahn) durchgeführt. Dabei wurde für IgA und IgM 5 μ l unverdünntes, für IgG mit isotoner Kochsalzlösung 1:10 verdünntes Patientenserum in die vorgestanzten Auftragsstellen der gebrauchsfertigen, das spezifische Antiserum enthaltenden Agarschicht abgefüllt.

Auswertung

Nach einer 3 tägigen Diffusionsdauer wurde der Präzipitadurchmesser gemessen. Anhand einer vorher ermittelten Standardkurve wurden die absoluten Werte direkt abgelesen. Bei der IgG-Bestimmung wurde der abgelesene Wert mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert.

2. Liquor

Für die Bestimmung der Immunglobuline im Liquor standen ebenfalls vorgefertigte Immundiffusionsplatten (LC-Partigen - Fa. Behringwerke Marburg/Lahn) zur Verfügung. Diese Platten erlauben eine quantitative Bestimmung von niedrigen Immunglobulinkonzentrationen. Hierbei wurden 20 μ l Liquorflüssigkeit in die vorgestanzten Löcher der jeweils mit einem spezifischen Antihumanserum beschickten Agarschichtplatten eingefüllt. Im Anschluß wurde eine 3 tägige Diffusionszeit bei Raumtemperatur abgewartet.

Zur Erhöhung des Kontrastes des IgM-Präcipitatringes wurde die Platte 24 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und danach die Gelschicht 30 Min. lang in einer 5 % Tanninlösung überschichtet. Nach Waschen der Platte in physiologischer Kochsalzlösung ließen sich die IgM-Präcipitadurchmesser ermitteln.

Auswertung:

Nach Ausmessen des Präcipitadurchmessers erfolgte die Auswertung wie oben beschrieben.

Zur Qualitätskontrolle wurden zugleich standardisierte Verdünnungslösungen angesetzt.

Die Immunglobulinklassen IgD und IgE wurden in die Studie nicht einbezogen, weil sie nicht im Liquor nachweisbar sind.

3. Krankengut

Die Liquoruntersuchungen wurden an einem bereinigten Kollektiv von insgesamt 75 Patienten durchgeführt. Als pathologisch galten Liquor und Blut von Patienten mit akut entzündlichen und chronisch entzündlichen cerebralen Prozessen sowie metastasierenden Hirntumoren.

Dem Normalkollektiv wurden Patienten mit degenerativen cerebralen und spinalen Prozessen sowie traumatisch bedingten Veränderungen und psychischen Störungen zugeordnet. Unter dem Begriff "Nichteinzuordnende" wurden alle Patienten, die in die genannten Gruppen nicht eindeutig zu integrieren waren, subsummiert.

4. Einzeluntersuchungen:

Die Diagnose wurde jeweils aufgrund neurologisch-psychiatrischer Kriterien, physikalischer und radiologischer Untersuchungsmethoden (EEG, Pneumencephalographie, Hirnszintigraphie, Liquordruckmessungen) und laborchemischer sowie zytologischer Liquorveränderungen (Liquorbeschaffenheit, Zuckergehalt, Eiweiß-Liquorelektrophorese, Zellzahl) gestellt.

Die Zuordnung zu den jeweiligen Patientengruppen erfolgte aufgrund der Kriterien der Voruntersuchungen. Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen wurden bei der Aufteilung der Patienten in die verschiedenen Krankheitsgruppen nicht berücksichtigt.

Ergebnisse:

I. Globale B- und T-Zellverteilung für das Normalkollektiv

1. Liquor

a) B-Zellen

Bei 39 untersuchten Patienten lag der Anteil der B-Zellen zwischen 10 % und 70 % je 100 ausgezählter Lymphozyten. Dabei zeigte die Verteilung ein im mittleren Bereich gelegenes Maximum. Bei 14 der 39 analysierten Patienten fanden sich 36-45 % B-Zellen, bei 13 Patienten lag der B-Zellgehalt zwischen 26 und 35 %. 16-25 % B-Zellen fanden sich in 4 Fällen, 5-15 % B-Zellen und 46-55 % B-Zellen in je 3 Fällen, 56-65 % und 66-75 % B-Zellen in je einem Fall (Abb. 1).

b) T-Zellen

Der T-Zellanteil lag beim gleichen Patientenkollektiv zwischen 10-68 %. Es ergab sich eine Verteilung mit einem im Mittelbereich gelegenen Maximum. Bei 14 Patienten fand sich 16-25 % T-Zellen. Bei 8 Patienten betrug der T-Zellanteil 26-35 %. 36-45 % T-Zellen und 5-15 % T-Zellen hatten je 6 Patienten, 46-55 % T-Zellen und 50-65 T-Zellen je 2 Patienten und 68 % T-Zellen 1 Patient (Abb. 2).

2. Blut

a) B-Zellen

Bei 39 untersuchten Patienten lag der Anteil der B-Zellen zwischen 10 % und 50 % je 100 ausgezählter Lymphozyten. Das

Maximum der Verteilungskurve lag zwischen 10 % und 15 % B-Zellen, nämlich bei 19 der 39 analysierten Fälle. Ein höherer und ein niedrigerer Anteil an B-Zellen war seltener nachweisbar. 16-25 % B-Zellen fanden sich bei 11 Patienten, 36-45 % T-Zellen bei 6 Patienten, 26-35 % T-Zellen und 50 % bei je 1 Patienten. Mehr als 50 % B-Zellen wurden nicht ausgezählt. Demgegenüber wurde ein geringerer B-Zellgehalt nicht festgestellt (Abb. 3).

b) T-Zellen

Der T-Zellgehalt lag bei diesen Patienten zwischen 25 % und 75 % je 100 ausgezählter Zellen. Das Maximum der Verteilung lag hier zwischen 46 % und 55 % bei 12 Patienten. 10 Patienten hatten einen T-Zellgehalt von 56-65 %, 8 Patienten von 65-75 % und 7 Patienten von 36-45 %. Bei 2 Patienten fanden sich 25% bzw. 30 % T-Zellen (Abb. 4).

II. B- und T-Zellverteilung bei verschiedenen Krankheitsprozessen

1. Akut entzündliche virale und bakterielle Prozesse

a) Liquor

In diese Gruppe fielen 12 Patienten. Bei ihnen lag der B-Zellgehalt in einem Bereich zwischen 20 % - 80 % gleichmäßig verteilt. (Abb. 1)

Die T-Zellen lagen bei denselben Patienten in einem Bereich zwischen 10 % und 40 % mit einem Maximum der Verteilung von 10 %-15 % T-Zellen bei 5 Patienten. 16 %-25 % B-Zellen konnten

bei 4 Patienten ausgezählt werden, 26 %-35 % T-Zellen bei 1 Patienten und 36 %-40 % T-Zellen bei 2 Patienten (Abb. 2).

b) Blut

Die B-Zellen bei den entsprechenden Patienten waren in einem Bereich von 10 %-40 % pro 100 ausgezählter Zellen nachweisbar, 5 %-15 % B-Zellen fanden sich bei 7 Patienten, 16 %-25 % B-Zellen bei einem Patienten und 26 %-35 % B-Zellen bei 4 Patienten (Abb. 3).

Der T-Zellanteil der entsprechenden Patienten lag zwischen 20% und 60 % mit einem Maximum im Bereich zwischen 46 % und 55 % T-Zellen in 7 Fällen. 36 %-45 % T-Zellen fanden sich in 3 Fällen, 60 % T-Zellen und 20 % T-Zellen in einem Fall (Abb. 4).

2. Chronisch entzündliche Demyelinisierungsprozesse(Encephalitis disseminata)

a) Liquor

Der B-Zellgehalt wurde bei 8 Patienten in einem Bereich von 20 %-80 % gefunden. Im Einzelnen ergab sich folgende Verteilung: 15 %-25 % B-Zellen hatten 2 Patienten. 46 %-55 % B-Zellen 2 Patienten, 55 %-65 % B-Zellen 2 Patienten, 70 % B-Zellen 1 Patient, 80 % 1 Patient (Abb. 1).

Die T-Zellen waren in einem Bereich von 10 %-33 % nachweisbar, 10 %-15 % T-Zellen und 16 %-25 % T-Zellen wurden bei 4 Patienten, 33 % T-Zellen bei einem Patienten gefunden (Abb. 2).

b) Blut

B-Zellen waren zwischen 15 %-40 % nachweisbar: 15 % B-Zellen wurden einmal, 20 % B-Zellen 3 mal, 25 % B-Zellen einmal, 30 % B-Zellen 2 mal und 40 % B-Zellen einmal gefunden.

(Abb. 3)

Der T-Zellgehalt lag zwischen 42 % und 65 %. 42 % T-Zellen wurden bei einem Patienten, 45 % T-Zellen bei einem Patienten, 50 % T-Zellen bei einem Patienten, 60 % T-Zellen bei 4 Patienten und 61 % T-Zellen bei einem Patienten ermittelt

(Abb. 4).

3. Neoplastische cerebrale Prozesse

Die Untersuchungen wurden an 6 Patienten mit Hirn- oder Rückenmarksmetastasen extraspinal und -cerebral gelegener Tumoren durchgeführt.

a) Liquor

Der B-Zellgehalt lag zwischen 20 % und 64 %. Bei den einzelnen Patienten wurde folgender B-Zellgehalt festgestellt: 20 %, 33 %, 36 %, 40 %, 45 % und 64 % (Abb. 1).

T-Zellen waren in einem Bereich von 14 %-30 % nachweisbar. Davon entfielen 14 % T-Zellen auf einen Patienten, 20 % T-Zellen auf 3 Patienten, 25 % und 30 % T-Zellen auf je einen Patienten (Abb. 2).

b) Blut

Hier wurde ein B-Zellgehalt zwischen 15 % und 30 % ermittelt. 15 % B-Zellen wurden in je 2 Fällen, 20 % B-Zellen in je 2 Fällen, 25 % B-Zellen in je einem Fall und 30 % B-Zellen in je einem Fall gefunden (Abb. 3).

Die T-Zellen lagen zwischen 40 und 60 %. 40 % T-Zellen hatten 3 Patienten, 45 % T-Zellen 1 Patient, 50 % T-Zellen 1 Patient und 60 % T-Zellen 1 Patient. (Abb. 4)

4. "Nicht-Einzuordnende"

Bei dem heterogenen Krankengut der in dieser Gruppe zusammengefaßten Patienten wurden folgende Einzelergebnisse gewonnen.

a) Liquor

In 6 Fällen von Polyneuropathie wurde in je einem Fall ein B-Zellgehalt von 10 % und 15 % und in je 2 Fällen von 40 % und 45 % gefunden.

Bei 2 Patienten mit Lues Stadium 3 betrug der B-Zellgehalt 25 % bzw. 45 %.

Ein Fall von Morbus Recklinghausen zeigte eine B-Zellzahl von 35 %.

1 Patient mit neuraler Muskelatrophie hatte eine B-Zellzahl von 15 % (Abb. 1).

Bei den entsprechenden Krankheitsbildern fanden sich im Einzelnen folgende T-Zellwerte:

Polyneuropathie: 60 % T-Zellen einmal, 40 % T-Zellen einmal, 35 % T-Zellen und 30 % T-Zellen. In zwei Fällen fanden sich 10 % T-Zellen.

Bei den Patienten mit Lues fanden sich je einmal 33 %
und 23 % T-Zellen.

Im Falle der neuralen Muskelatrophie wurden 25 % T-Zellen
ermittelt.

Der Patient mit Morbus Recklinghausen bot 30 % T-Zellen.
(Abb. 2)

b) Blut

Bei den Patienten mit Polyneuropathie fanden sich je einmal
10 % und 15 % B-Zellen und je zweimal 30 % und 45 % B-Zellen.

Die Fälle mit Lues zeigten 25 % und 46 % B-Zellen.

Beim Morbus Recklinghausen waren 36 % B-Zellen nachweisbar.

Bei dem Patienten mit neuraler Muskelatrophie betrug die
B-Zellzahl 15 % (Abb. 3).

Für die T-Zellen bei den entsprechenden Erkrankungen wurden
folgende Werte festgestellt:

Bei Patienten mit Polyneuropathie fanden sich 46 % und
75 % T-Zellen in je einem Fall und 50 % T-Zellen und 60 %
T-Zellen in je 2 Fällen.

Der T-Zellgehalt bei Lues betrug einmal 15 % und einmal 50 %,
bei Morbus Recklinghausen 70 %,
und bei neuraler Muskelatrophie 50 %. (Abb. 4)

B-Zellen und Immunglobuline während einer Virusmeningitis

Bei einem Patienten mit einer gesicherten Herpesvirusmeningitis wurden zum Zeitpunkt der Klinikeinweisung, nach einer und nach sechs Wochen das Verhalten von B-Zellen und Immunglobulinen im Liquor und Blut untersucht. Im Verlauf der Erkrankung stiegen die B-Zellen bei einem Ausgangswert von 20 % nach einer Woche auf 37 % und nach sechs Wochen auf 70 % an. Parallel dazu kam es zu einer deutlichen Erhöhung des IgG- und IgM-Spiegels, während IgA nur unwesentlich vermehrt gefunden wurde. Im Blut dagegen fanden sich keine entsprechenden Veränderungen (Abb. 5).

B-Zellgehalt und Immunglobulinspiegel

Die Immunglobuline im Liquor und Serum wurden bei 57 Patienten bestimmt und ins Verhältnis zu den absoluten B-Zellzahlen gesetzt. Sowohl im Serum als auch in der Cerebrospinalflüssigkeit ließ sich dabei keine Relation zu der Anzahl der B-Zellen und der Höhe der gefundenen Immunglobuline finden (Abb. 6, 7, 8).

Statistische Analyse

Die Analyse der bei den verschiedenen Gruppen sowie bei dem Gesamtkollektiv erhaltenen Werte ergab unter Anwendung

der entsprechenden statistischen Methoden folgendes:

Eine gesicherte Signifikanz ($p < 0,05$) war nur mit Bezug auf eine globale Vermehrung der B-Zellen und Erniedrigung der T-Zellen im Liquor verglichen mit den entsprechenden Werten im Blut nachweisbar.

Ebenfalls signifikant ist die Vermehrung der B-Zellen bei chronisch entzündlichen Krankheitsprozessen im Vergleich zu den übrigen Krankheitsgruppen.

Diskussion

Die Bewertung der in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse kann sich nur mittelbar an bereits bekannte Eigenschaften einer Immunreaktion im ZNS anlehnen, da Untersuchungen auf dem hier bearbeiteten Gebiet in vergleichbarem Ausmaß bislang nicht vorgenommen worden sind. Als Ausgangspunkt der Betrachtungen sind daher Studien über die Verteilung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen im übrigen Organismus, insbesondere im peripheren Blut, sowie über das Verhalten der Immunglobuline und Zellen im Liquor heranzuziehen.

Im Hinblick auf fehlende Vergleichsbefunde ist zunächst die globale Verteilung der T- und B-Zellen von Interesse. Hier hat sich gezeigt, daß im Vergleich zum peripheren Blut der Anteil der B-Zellen auf Kosten der T-Zellen erhöht ist. Zweifellos ist der Einwand berechtigt, daß die Verhältnisse des Gefäßapparates keineswegs mit denen des Liquor gleichgesetzt werden können; die Gegenüberstellung ist indes die einzige Möglichkeit zur Verteilung der freien Zellen Stellung zu nehmen. Zugunsten einer solchen Betrachtung könnte allerdings die Tatsache sprechen, daß es sich jeweils um quasi geschlossene Flüssigkeitssysteme handelt, auf die sich zumindest tiefergreifende Immunreaktionen selbst dann auswirken, wenn sie in soliden Geweben ablaufen. Dabei dürfte eine Rückwirkung wegen der unterschiedlichen Größenordnung auf die zellulären Elemente des Immunsystems im ZNS stärker ausgeprägt sein als auf die des Blutes. Unter der Annahme einer vergleichbaren Zirkulationsrate muß daher geschlossen werden, daß das humorale Immunsystem im ZNS stärker vertreten ist als im übrigen Organismus.

Dieses unerwartete Ergebnis fordert eine kritische Betrachtung der angewandten Methoden. Sie soll hier zugleich auch für die noch zu erörternden Teilergebnisse angeschlossen werden. Für die vorliegenden Untersuchungen sind Techniken herangezogen worden, die auch zur Differenzierung der B- und T-Zellen im Blut allgemein Verwendung finden. Die in diesem Zusammenhang bekannten Streubreiten sind zweifellos auch bei der Differenzierung von Liquorzellen zu erwarten. Sie werden zwangsläufig hier sogar noch größer, weil die Zellzahl wesentlich niedriger liegt als im Blut. Fehlbestimmungen auf dem Boden einer irrtümlichen Zuordnung von Zellen, die wie Granulozyten oder Monozyten nicht dem Immunsystem angehören, sind durch entsprechende Kontrolluntersuchungen zur Darstellung phagozytischer Elemente ausgeschlossen worden: ihr Anteil an den identifizierten Zellen lag mit weniger als 10 % unter der Fehlerbreite der Methoden und ist daher zu vernachlässigen. Somit kann die statistisch ermittelte Signifikanz der B-, T-Zellverschiebung ($p < 0,05$) aufrecht erhalten werden.

Von großem Interesse ist die Verteilung der verschiedenen Lymphozytenpopulationen bei unterschiedlichen Krankheitsprozessen. Hierbei hat sich lediglich in der Gruppe der chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS eine signifikante Verschiebung ergeben, die eine eindeutige absolute und relative Vermehrung der B-Zellen ($p < 0,05$) erkennen läßt. Dagegen sind die T-Zellen anteilmäßig nicht stärker vertreten als bei der Kontrollgruppe. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß gerade bei den chronisch-entzündlichen Prozessen nahezu gesetzmäßig die Immunglobuline im Liquor vermehrt sind. Die Aktivität der humoralen Immunantwort drückt sich somit in der Vermehrung zugleich der Produktionsstätten wie auch des Endproduktes, der Antikörper, aus. Bei

absolut erhöhter Liquorzellzahl liegt gegenüber den T-Zellen, die dann ebenfalls absolut vermehrt sind, eine überproportionale Vermehrung der B-Zellpopulation vor. Dies unterstreicht die Rolle des humoralen Anteils der Immunreaktion im ZNS und bestätigt die Annahme, daß sie hier gegenüber dem übrigen Organismus vermehrt repräsentiert ist. Da bei akut entzündlichen Prozessen eine Vermehrung der B-Zellen nicht regelmäßig vorgefunden worden ist, muß angenommen werden, daß die aktivierten Lymphozyten vergleichsweise spät in den Liquor übertreten.

Die Verlaufsstudie an einer Virusmeningitis konnte eindeutig eine bevorzugte Aktivierung des B-Zellsystems bei akuten Krankheitsprozessen belegen, da der B-Zellgehalt bei gleichbleibendem T-Zellanteil zunahm, was in dieser Phase der Erkrankung auf Kosten der zellulären Bestandteile, die nicht dem Immunsystem angehören, erfolgte. Die synchrone Erhöhung des Immunglobulinspiegels ergänzt diese Beobachtung der Aktivierung der humoralen Immunantwort.

Unerwartet ist das Fehlen einer engen Korrelation zwischen B-Zellgehalt und Immunglobulinspiegel im Liquor. Ist dies für IgA und IgM zufolge der extrem niedrigen Werte aus methodischen Gründen noch verständlich, so überrascht es doch bei dem in einem vergleichsweise breiten Bereich vorliegenden IgG. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die identifizierten B-Lymphozyten Vorstufen der antikörpersynthetisierenden Plasmazellen darstellen, welche im Gegensatz zu den noch nicht ausdifferenzierten Lymphozyten bevorzugt in organisierten Strukturen, etwa in Lymphknoten sesshaft sind.

Bemerkenswert ist die offensichtliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Zelldifferenzierung in Liquor und Blut. Sie

könnte als Hinweis auf die Eigenständigkeit des Immunsystems im ZNS gewertet werden. Doch ist zu bedenken, daß Änderungen der Aktivität des Immunsystems im ZNS zufolge der Massenverhältnisse, selbst in Fällen langdauernder hochgradiger Stimulation, keine Rückwirkungen solchen Ausmaßes auf die Verhältnisse im peripheren Blut ausüben können, daß hier die den Methoden anhaftende Ungenauigkeit deutlich übertroffen wird.

Insgesamt brachten die Untersuchungen neue Aspekte zur Präsenz und Reaktionsbereitschaft des Immunsystems im ZNS, indem sie ein Dominieren des humoralen Anteils aufzeigten. Diese Situation liegt bereits im Normalfalle, d.h. ohne erkennbare Stimulation vor. Im Krankheitsfalle, insbesondere bei chronisch-entzündlichen Prozessen, steigert sich die Aktivität dieses humoralen Anteils mehr als die der zellvermittelten Immunreaktion. Rückwirkungen auf das Immunsystem des übrigen Organismus sind nicht nachweisbar.

Zusammenfassung

An einem Kollektiv von 75 Patienten wurden die im Liquor enthaltenen Lymphozyten charakterisiert: B-Lymphozyten wurden durch Nachweis wandständiger Immunglobuline mit der Fluoreszenztechnik, T-Lymphozyten durch Nachweis von membrangebundenen Rezeptoren für Hammelerythrozyten mit dem Rosettentest identifiziert. Gleiches wurde mit den Lymphozyten des peripheren Blutes vorgenommen. Weiterhin wurden in Liquor und Blut IgA, IgG und IgM mit der radialen Immundiffusion quantitativ erfaßt.

Die Patienten wurden in verschiedenen Gruppen zusammengefaßt und einer Kontrollgruppe mit traumatischen und degenerativen Prozessen gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, daß bei allen Gruppen im Vergleich zum Blut die Zahl der B-Lymphozyten und die der T-Lymphozyten erniedrigt war. Die getrennte Analyse der einzelnen Gruppen ergab, daß Patienten mit chronisch entzündlichen Prozessen eine signifikant erhöhte B-Zellzahl aufweisen, der Anteil der T-Zellen jedoch unverändert bleibt. Eine analoge Entwicklung zeigte sich in einem über 6 Wochen verfolgten Fall mit einer Virusmeningitis, indem auch hier die Zahl der B-Zellen absolut und relativ zunahm. Im Kollektiv bieten akut entzündliche Prozesse keine Verschiebung der B-T-Zell-Relation.

Die Bestimmung der Immunglobuline ergab in der Gruppe der chronisch entzündlichen Prozesse des ZNS eine Vermehrung im Liquor, insbesondere des IgG, in einzelnen Fällen auch des IgA und des IgM. Ein analoges Verhalten konnte auch im Verlaufe einer Virusmeningitis nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der gleichzeitig im Blut vorgenommenen Untersuchungen ließen zu den Werten der entsprechenden Untersuchungen im Liquor keinen Bezug erkennen.

Mit den vorliegenden Untersuchungen wurde somit gezeigt, daß der humorale Anteil des Immunsystems im Liquor bzw. im ZNS stärker vertreten ist als im übrigen Organismus, und daß bei einem Stimulus die Aktivität der humoralen Seite eine überproportionale Steigerung erfährt.

Literaturverzeichnis:

1. Aiuti, F., F. Lacava, et.al.:
Surface Markers on Human Lymphocytes:
Studies of normal subjects and of patients
with immunodeficiencies.
Clin.exp.Immunolog. (1973) 15, 43-52
2. Baumer, H.: Über die Beziehung der Plasmazellen im Liquor
zur Aktivität der M.S.
Verh.Dtsch. Ges. Innere Med. 72. Kongreß 1969,
Wiesbaden
3. Bauer, H.H., A. Gottesleben und K. Warecke:
Quantitative Immunchemie der Liquorproteine-
Zukunft der Neurologie
G.Thieme Verlag, Stuttgart, 1967, 200
4. Catovsky, D., E.Miliani:
Clinical Significance of T-Cells in Chronic
lymphocytic Leukaemia
Lancet Sept. 28 (74)
5. Cohen, G.: T- und B-Lymphozyten bei Chron.-lymph. Leukämie
und Lymphogranulomatose
Fischer Verlag Stuttgart 1975
6. Delank, H.W.: Klin..Liquordiagnostik
Der Nervenarzt 43, 2, Febr. 72
7. Delank, H.W.: Immunglobuline im Liquor cerebrospinalis
und ihr klin. diagnost. Aussagewert.
Der Nervenarzt 42, 9, 71, 83-490

8. Delank, H.W., W.T.Wrede:

Der klini. Wert quant.-Immunchem. Bestimmung
versch. Proteine im Liquor cerebrospinalis
Klin.Wschr. 47, 1270 (1969)

9. Frick, E.,: Pathogenese entzündlicher Nervenerkrankungen

F. d. Med. 87, 29, 1191-1194

10. Gleichmann, E. und H.Deichler:

Differenzierung der Hypergammaglobulinämie
bei entzündlichen Lebererkrankungen
Klin.Wschr. 45, 684 (1967)

11. Gottesleben, A., H.H.Bauer:

Quantitative Immunchemie der Liquorproteine
bei entzündlichen Erkrankungen des Nerven-
systems.
German Medical Monthly 12, 333 (1967)

12. Günther, O.G.: Wirkstoffe d. Spätreaktionen

DMW 19, 5 (1972) 96, 839-923

13. Kanzow, U., W. Rosenkranz:

Immunglobuline bei Gesunden und Patienten mit
einer Paraproteinämie
Klin.Wschr. 45, 10337 (1967)

14. Koch, Fr.,: IgM-Nachweis im Liquor

Diagnostik 4/74, 167

15. Mancini, G., A.O. Carbonara, J.F. Heremans:

Immunochemistry 2, 235 (1965)

16. Nordling, S., L.C. Andersson, P. Hägry:

Seperation of T- and B-lymphocytes by preparative
cell elektrophoresis. Europ.Journ. of Immunology
Vol. 2/1972, 5

17. Schneider, U., H. zur Hausen:

Epstein-Barr Virus-Inducted Transformation
of Human Leukocytes After Cell Fractionation
Int.J. Cancer: 15, 59-66 (1975)

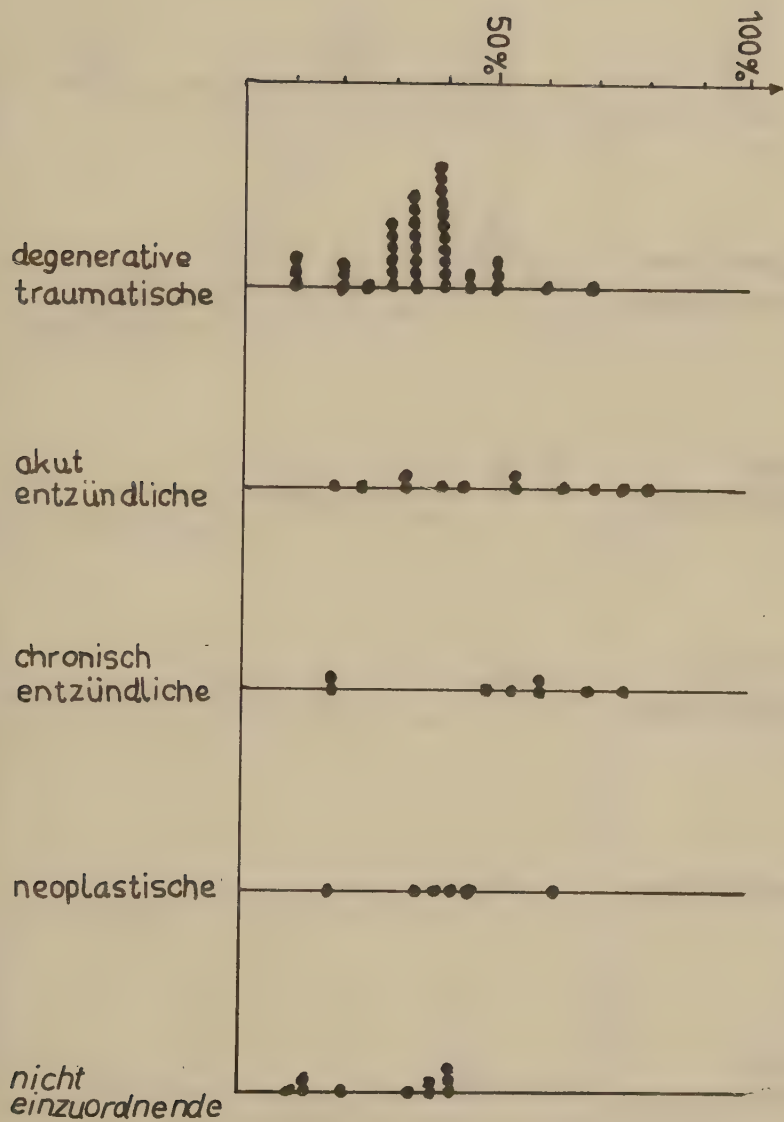
18. Schwenk, H.U.: Immunolog. Zellmarker auf Lymphoplasten
und den Lymphozyten dieser Patienten nach ein-
jähriger Kombinationszytostase
Habilitationsschrift 1975

19. Sörnas, Rume: The Cytology of the Normal Cerebrospinal Fluid
Acta Neuro Scandinav. 48, 313-320, 1972

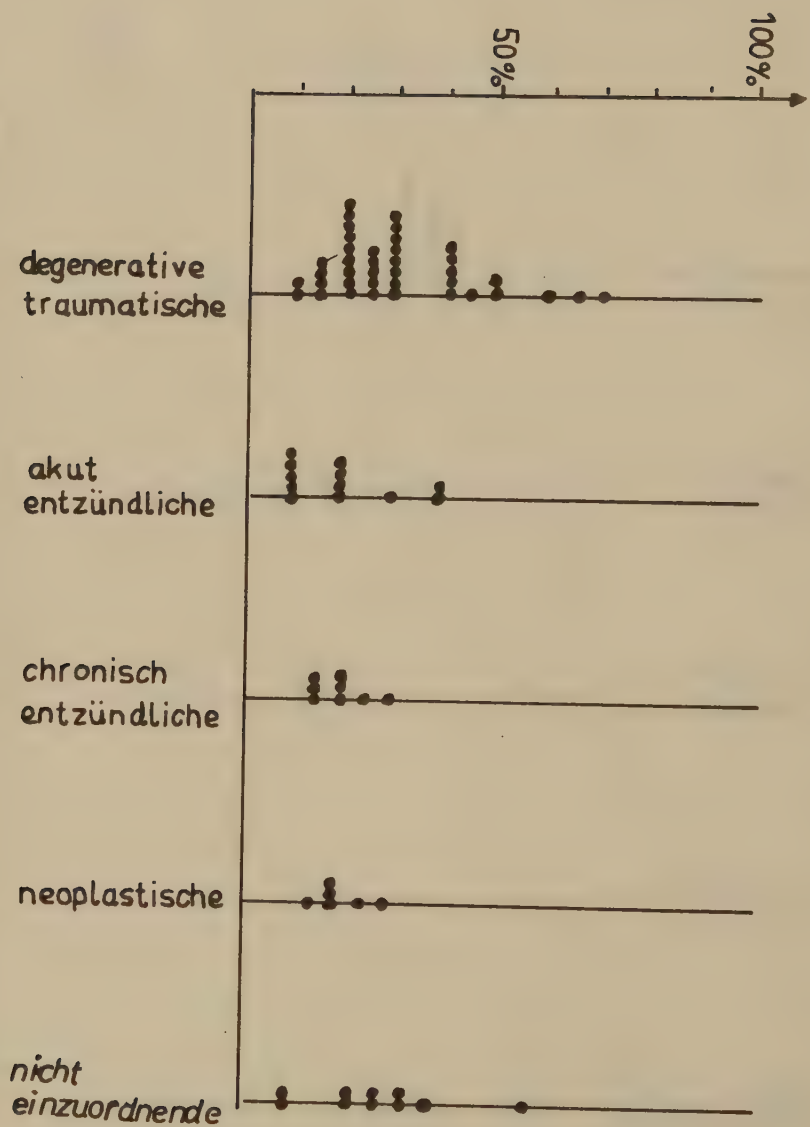
20. Syamal, K., M.D. Datta, S. Robert, M.D. Schwarz:
Infektious(?) Myasthenia B-Zellen im Thymus
NEJ of Med. Dez. 12, 74, 1304-1305

21. Thurman, G.B., D.M.Strong, A. Ahmed, S.S. Green, K.W. Sell,
R.J. Hartzmann, F.H. Bach:
Human Mixed Lymphocyte Cultures
Clin. exp. Immunol. (1973) 15, 289-302

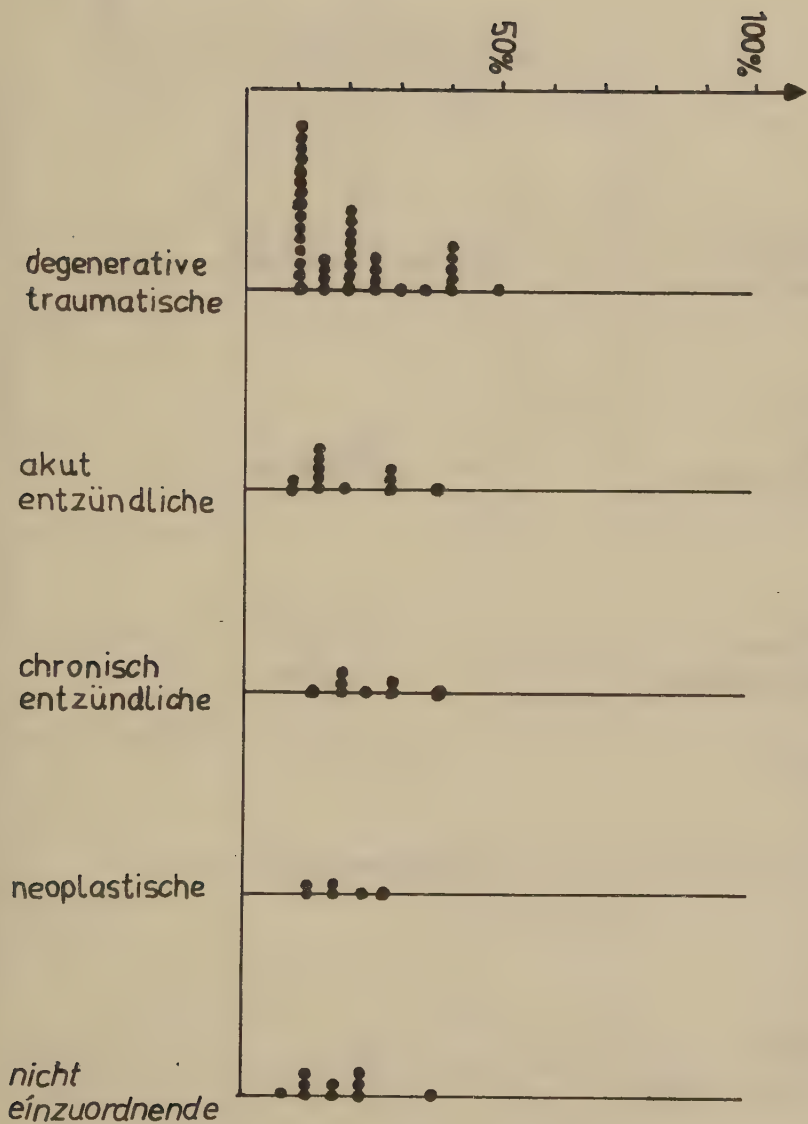
B-Zellgehalt im Liquor bei verschiedenen Krankheitsprozessen



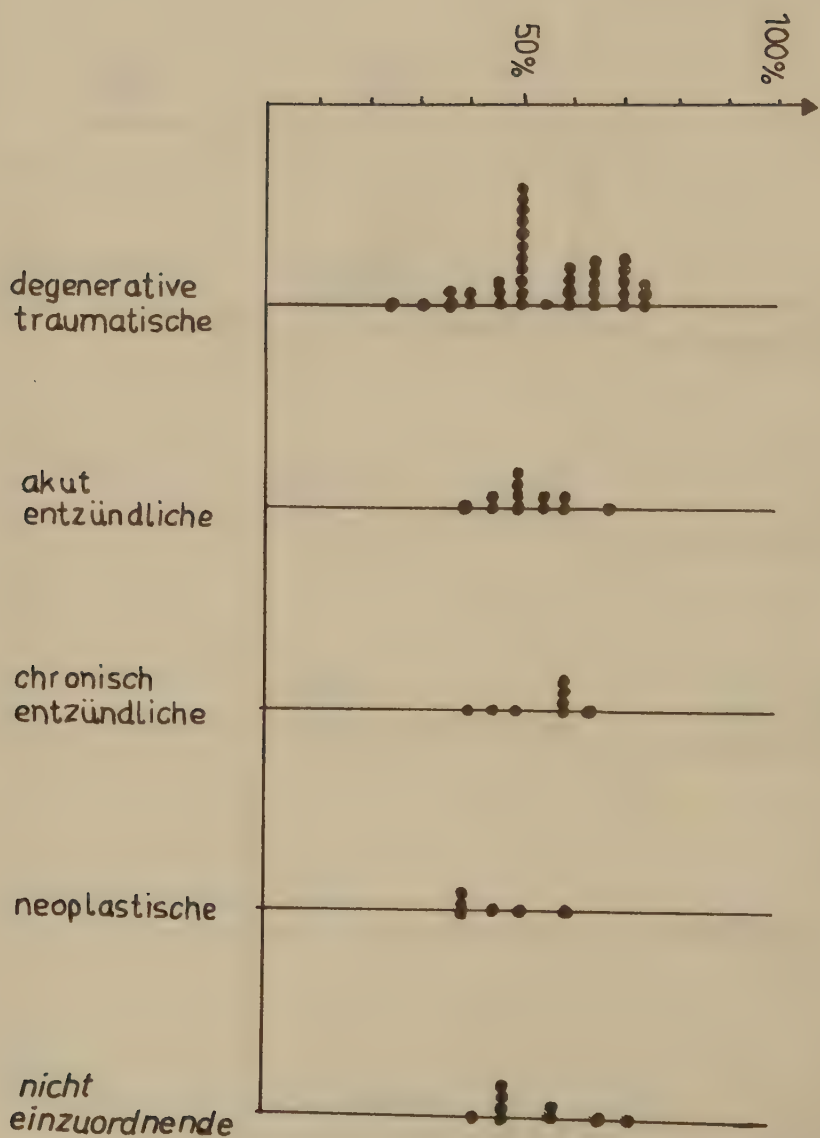
T-Zellgehalt im Liquor bei verschiedenen Krankheitsprozessen



B-Zellgehalt im Blut bei verschiedenen Krankheitsprozessen



T-Zellgehalt im Blut bei verschiedenen Krankheitsprozessen



VERHALTEN VON IMMUNGLOBULINEN UND B - ZELLEN in Liquor und Blut während einer Virusmeningitis

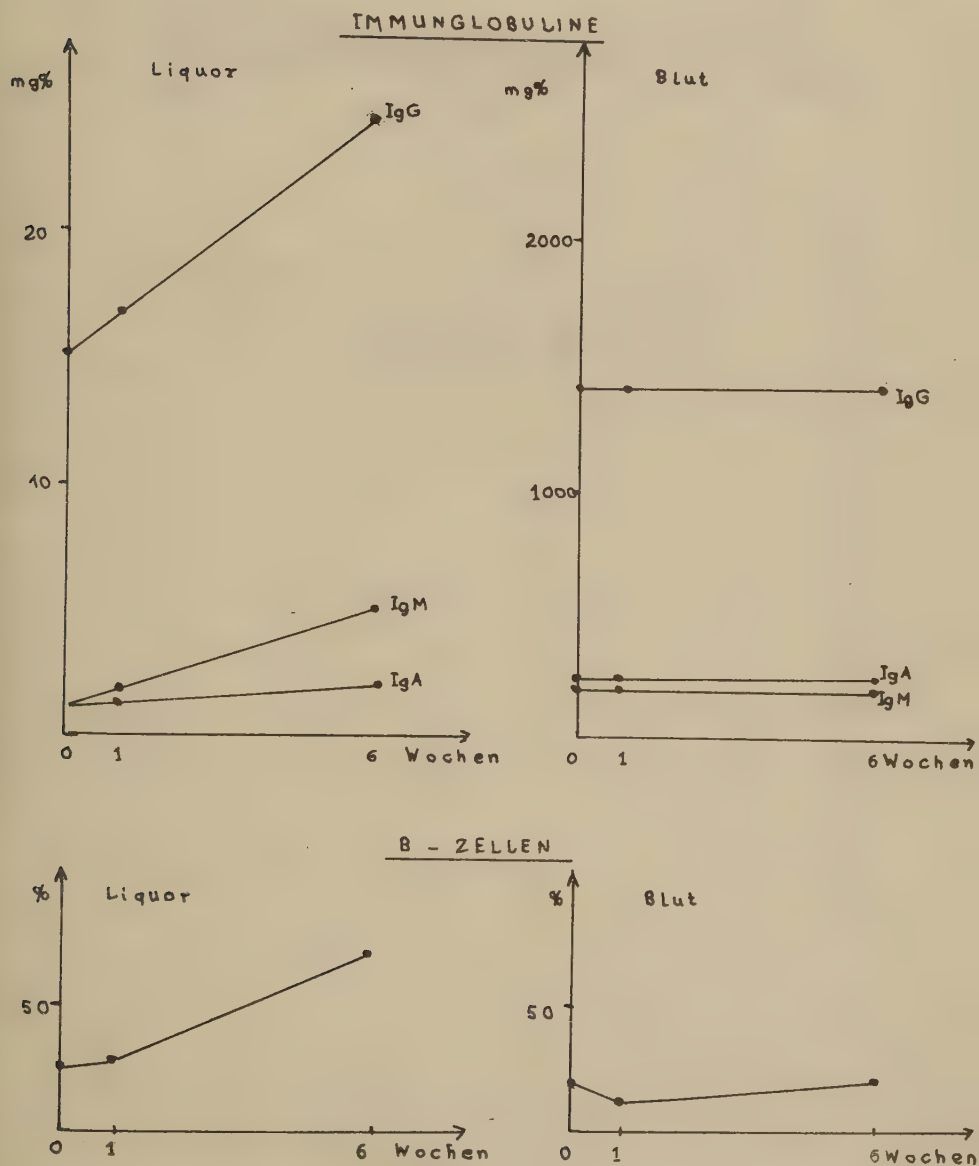
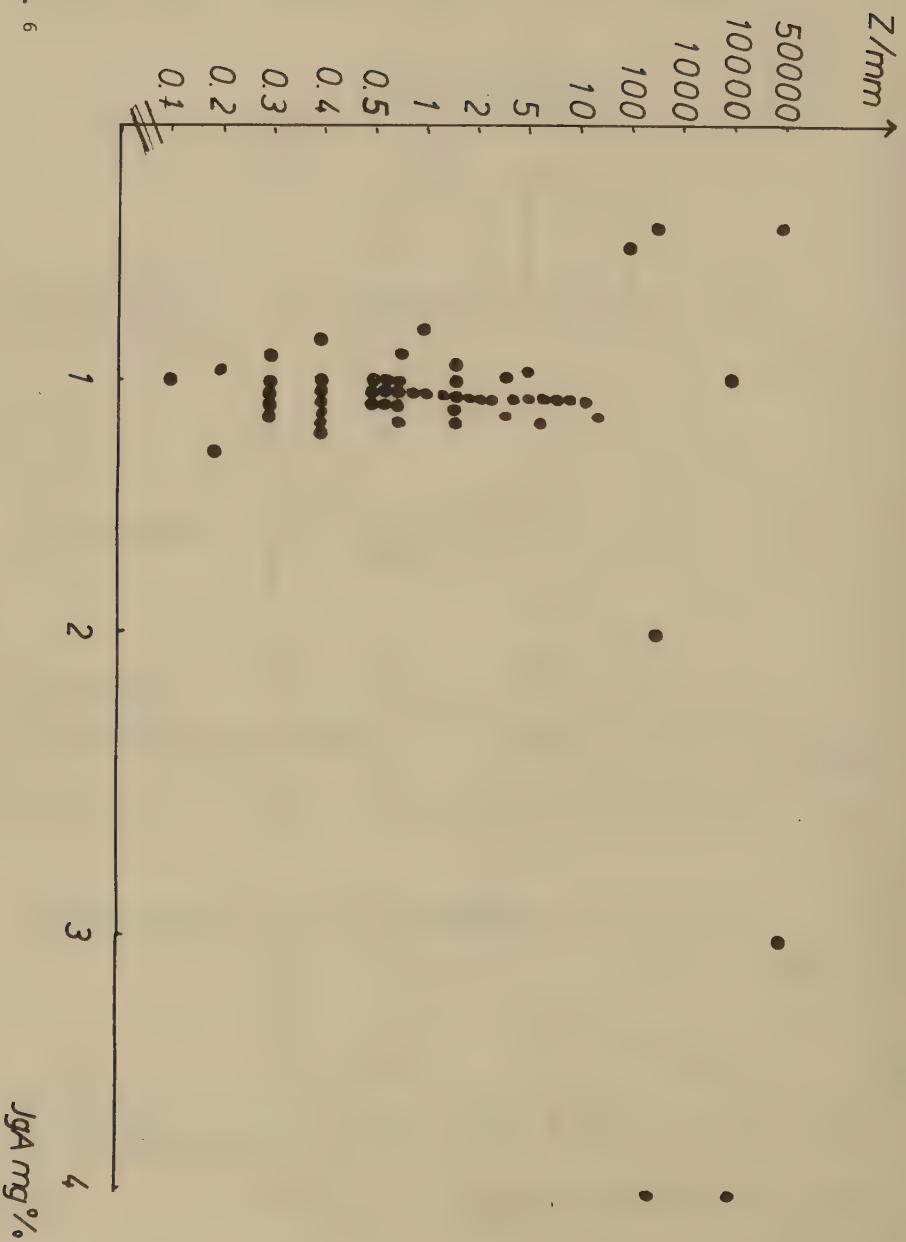


Abb. 5

B-Zellgehalt und JgA-Spiegel im Liquor



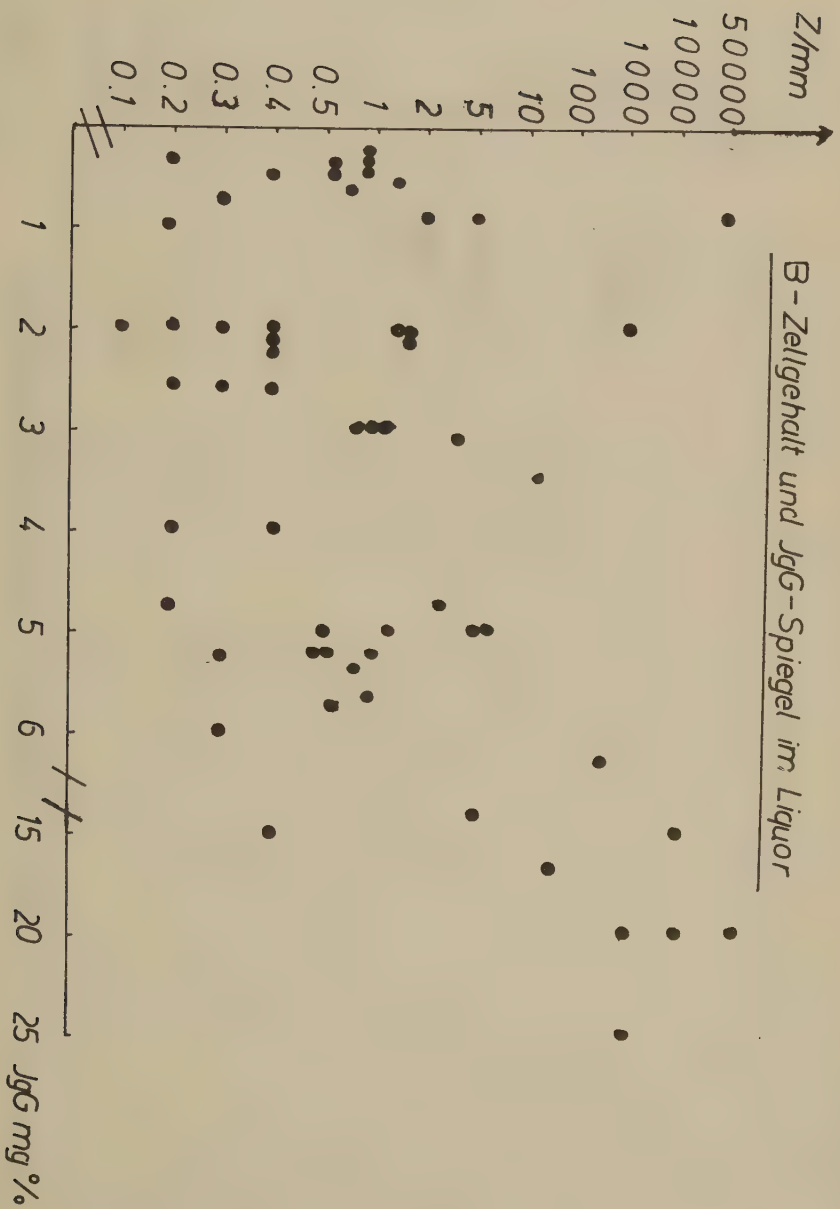
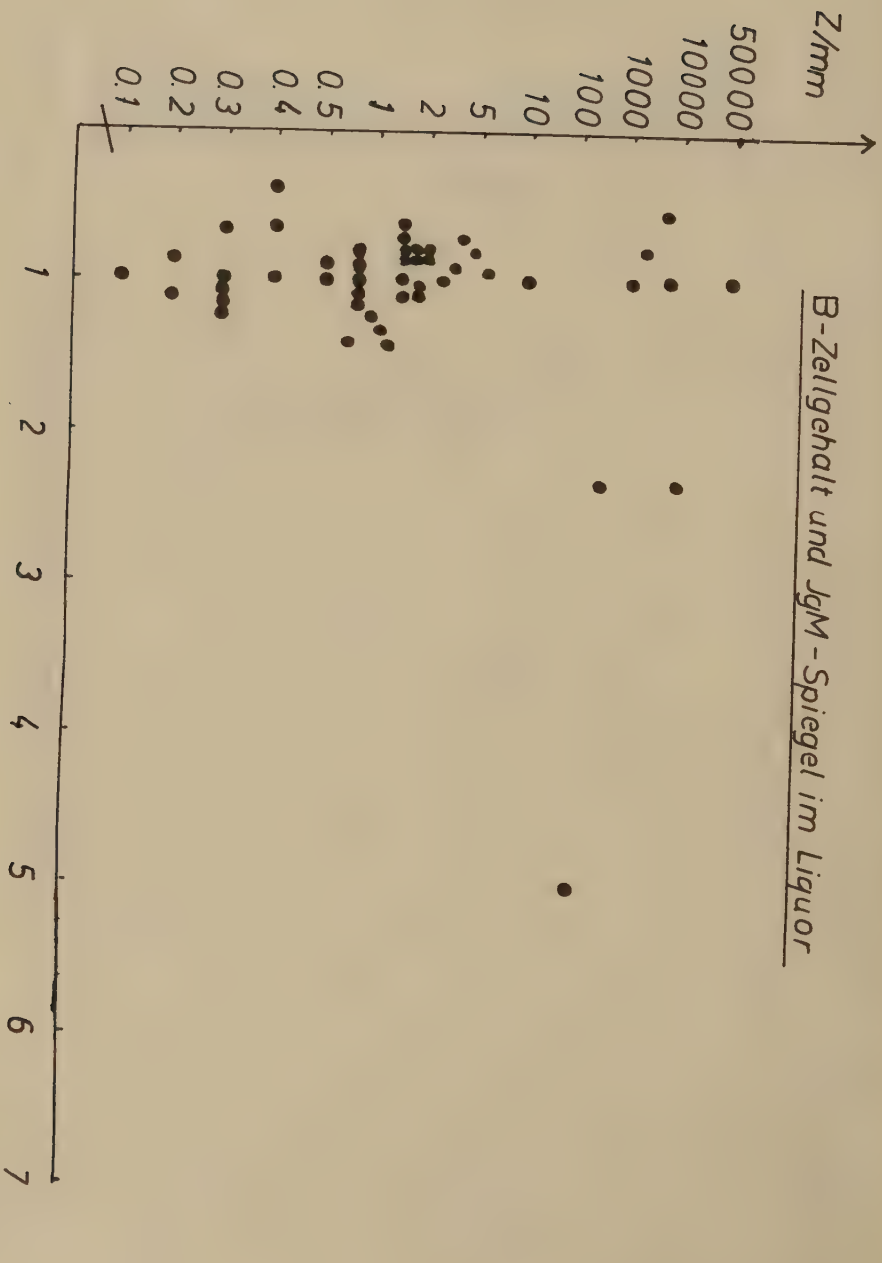


Abb. 7

B-Zellgehalt und IgM -Spiegel im Liquor



Lebenslauf

Am 2. Mai 1943 wurde ich als Sohn des damaligen Bankbeamten Ferdinand Teuber und seiner Ehefrau Maria, geb. Pack, in Eger geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Weiden trat ich in das dortige humanistische Gymnasium und später in das Hans Carossa Gymnasium in Landshut ein, wo ich am 15. Juli 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Das Studium der Medizin nahm ich im Wintersemester 1963/64 an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen auf. Nach zweisemestriger Befreiung bestand ich im April 1968 die Ärztliche Vorprüfung und im August 1971 das medizinische Staatsexamen.

Nach einjähriger Tätigkeit als Medizinalassistent am Kreiskrankenhaus in Haßfurt und Institut und Poliklinik für klinische Immunologie in Erlangen erhielt ich am 3. November 1972 die Approbation. Seit dieser Zeit bin ich hier als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle beschäftigt.

Am 5. 3. 1970 schloß ich die Ehe mit Margot Frank.

Erlangen, 24. Oktober 1975

Josef Teuber

